

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10332693 A**

(43) Date of publication of application: **18 . 12 . 98**

(51) Int. Cl

G01N 33/53

G01N 1/28

G01N 33/48

(21) Application number: **09139608**

(22) Date of filing: **29 . 05 . 97**

(71) Applicant: **TOKUYAMA CORP A & T:KK**

(72) Inventor:
IWAMOTO HISAHICO
MIURA KEISUKE
YOSHIMURA YOSHINORI

(54) **METHOD FOR PRE-TREATING SPECIMEN**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for pre-treating specimen for measuring the latter-period product (AGE) of Maillard reaction which is watched as a novel clinical marker of diabetes mellitus or a complication of diabetes mellitus in the field of clinical inspection.

SOLUTION: In a method for pre-treating specimen, a specimen for measuring the latter-period product (AGE)

of Maillard reaction is heated to 50-100°C under the presence of an anionic surface active agent. In addition, the AGF is detected by making an antibody which specifically reacts to the AGE to act on the heated specimen. The anionic surface active agent is sodium dodecyl sulfate and the anti-AGE antibody is a carboxymethylation antibody or an anticarboxymethylized peptide antibody. The AGE is a carboxymethylized protein or a carboxymethylation peptide.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-332693

(43) 公開日 平成10年(1998)12月18日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

V

1/28

33/48

A

33/48

1/28

J

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平9-139608

(22) 出願日 平成9年(1997)5月29日

(71) 出願人 000003182

株式会社トクヤマ

山口県徳山市御影町1番1号

(71) 出願人 591258484

株式会社エイアンドティー

東京都日野市日野320番地の11

(72) 発明者 岩本 久彦

山口県徳山市御影町1番1号 株式会社トクヤマ内

(72) 発明者 三浦 圭介

山口県徳山市御影町1番1号 株式会社トクヤマ内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検体の前処理方法

(57) 【要約】

【課題】 臨床検査領域に於いて、糖尿病または糖尿病合併症の新規な臨床マーカーとして注目されているメイラード反応後期生成物 (AGE) を測定するための被検体の前処理法を提供する。

【解決手段】 被検体をドデシル硫酸ナトリウム等のアニオン性界面活性剤の存在下に50~100℃で加熱処理することを特徴とするメイラード反応後期生成物 (AGE) 測定用被検体の前処理方法。また、該前処理した被検体にAGEと特異的に反応する抗体を作用させてAGEを検出することを特徴とするAGEの測定方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 メイラード反応後期生成物（AGE）測定用の被検体をアニオン性界面活性剤の存在下、50～100℃で加熱処理することを特徴とする被検体の前処理方法。

【請求項2】 アニオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムである請求項1記載の被検体の前処理方法。

【請求項3】 請求項1記載の方法で前処理された被検体に抗メイラード反応後期生成物抗体（抗AGE抗体）を作用させ、免疫学的反応によりAGEを検出することを特徴とするAGEの測定方法。

【請求項4】 抗AGE抗体が抗カルボキシメチル化タンパク質抗体または抗カルボキシメチル化ペプチド抗体であり、AGEがカルボキシメチル化タンパク質またはカルボキシメチル化ペプチドである請求項3記載のAGEの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はAGE測定用の被検体の前処理方法に関する。更に詳しくは、糖尿病または糖尿病合併症のマーカーとなりうる生体成分中のAGEを検出、あるいは該濃度を測定するための被検体の前処理方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 血液中のタンパク質はグルコースと非酵素的に反応して糖化され、糖化タンパク質となることが知られている。該糖化反応はメイラード反応と呼ばれ、前期段階および後期段階の反応に分けられる。前期段階の反応は、タンパク質の側鎖アミノ基やN末端アミノ基と糖のカルボニル基が反応し、シッフ塩基を経由してアマドリ転位化合物を生成するまでとされている。該前期段階反応生成物としては、例えば、ヘモグロビンA1Cや糖化アルブミン等が知られており、糖尿病の臨床マーカーとして用いられているのは周知の事実である。

【0003】 また、上記前期段階反応の後、タンパク質の側鎖アミノ基やN末端アミノ基に生成したアマドリ転位化合物は酸化、脱水、縮合等の複雑な反応を経由しAGE化されて後期段階反応生成物であるAGEに至る。該AGEは血管障害合併症の発症に関与しているとの報告がなされ（Monnier, V. M., et. al., New England Journal of Medicine, vol. 314, p403, 1986）、糖尿病患者における合併症の発症と進展に関与するものとして注目されるようになった。また、AGEには糖尿病合併症の発症と進展に関与する生物学的活性があるという報告もなされている（森崎ら、最新医学、第49巻、248頁、1994年）。更に、AGEは老人や糖尿病患者のレンズタンパク質、皮膚コラーゲン等に存在していることも報告されており（Dunn, J. A., et. al., Biochemistry, vol. 30, p1205, 1991）、AGEは糖尿病または糖尿病合併症の新規なマーカーとして有望視されている。

【0004】 AGEは複数の化合物の集合体であることが知られており、現在のところ、AGEの構造体としては、カルボキシメチル化タンパク質（以下、「CM化タンパク質」と略すこともある。）、ピラリン、ペントシジン、クロスリンA&B、ピロピリジン、或いはX1等が提唱されており、これらの定性、定量は特異抗体による検出やAGEを加水分解して液体クロマトグラフィーにてAGE化されたアミノ酸を検出する方法、AGEを加水分解してガスクロマトグラフィー／質量分析にてCM化されたアミノ酸を検出する方法等が挙げられる。しかしながら、AGEを間接的に測定する方法は操作が煩雑であり感度も低いという問題があることから、測定が容易であり感度も高い特異抗体による測定方法が多用されている。

【0005】 しかし、該特異抗体を用いた場合、試験管内（in vitro）で作成したAGEや組織におけるAGEの検出は可能であるが、体液中のAGEの検出はドットブロッキング法以外の方法で検出することは困難であった。そこで、この問題を解決するために、タンパク質分解酵素を用いた血清の前処理方法が提案された（39回日本糖尿病学会年次学術集会抄録集、p248, 1996）が、該前処理方法は操作が煩雑であるという問題点があった。

【0006】 一方、ドットブロッキング法による特異抗体を用いた体液中のAGEの検出は、前処理を行うことなく検出が可能である（日本腎臓学会誌、vol. 39, p243, 1997）が、ELISA法に比べて操作が煩雑であるという問題点があった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、本発明の目的は、被検体、特に体液由来の被検体中のAGEを特異抗体を用いてドットブロッキング法以外の方法で検出するに当たり、被検体中のAGEが検出可能となるような簡便な前処理方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、被検体、特に体液由来の被検体中のAGEをドットブロッキング法以外の方法で特異抗体を用いて検出する場合、被検体をアニオン性界面活性剤存在下で加熱するという簡便な処理を行うだけで、AGEを検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】 即ち、本発明は、メイラード反応後期生成物（AGE）測定用の被検体をアニオン性界面活性剤の存在下、50～100℃で加熱処理することを特徴とする被検体の前処理方法である。また、他の発明は、上記方法で前処理された被検体に抗メイラード反応後期生成物抗体（抗AGE抗体）を作用させ、免疫学的反応によりAGEを検出することを特徴とするAGEの測定方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に述べるが、本発明で使用する物質、製法、操作法は下記に限定されるものではない。

【0011】本発明で用いる被検体としてはタンパク質、ペプチド及び遊離アミノ酸のいずれかの成分（以下、これらを総称して「タンパク質等」ともいう。）が溶解若しくは懸濁している溶液であれば特に限定されない。ここで、ペプチドとはオリゴペプチドでもポリペプチドでも良く、例えばタンパク質の分解産物が挙げられる。上記タンパク質等は、生体成分由来であるのが一般的であり、該生体成分としては、例えば血液、尿、リンパ液、羊水、随液、唾液等の体液、皮膚コラーゲン、フィブロネクチン等の細胞外マトリックス、レンズタンパク質、動脈、腎臓等の組織等が挙げられる。被検体中に含まれるタンパク質等の濃度は、含まれるタンパク質等の種類に大きく依存するが（タンパク質等が遊離アミノ酸の場合には数 ng/ml のオーダーであり、タンパク質等がタンパク質の場合には数～数十重量%のオーダーである）、一般的には約0.001ppm～約30重量%である。

【0012】上記生体成分が体液である場合には、初めからタンパク質等が溶液若しくは懸濁液の形態で存在するので、そのまま被検体とすることが出来る。例えば、血漿には通常約7重量%のタンパク質が存在し、尿には通常約10～15 mg/ml の濃度でタンパク質が存在している。また、上記体液は成分調整等の処理を施したり緩衝液等で希釈したりして被検体とすることもできる。例えば血液を被検体として用いる場合には、通常血液は22重量%のタンパク質を含んでいるため、蒸留水や塩濃度の低い緩衝液等で赤血球を溶血させた後、緩衝液で希釈したものを被検体として使用するのが好ましい。また、上記生体成分が体液以外の組織や細胞である場合には、緩衝液等で希釈してタンパク質等の濃度が上記範囲となるように調整して被検体とするのが好適である。本発明に於いては、臨床検査に被検体として多用されている体液由来のタンパク質等を含む溶液を被検体として用いるのが好ましい。

【0013】本発明のAGEの測定方法では、免疫学的反応を利用しているため、被検体中に種々のタンパク質等が混在していてもAGEを測定することができるが、特定のタンパク質等を予め分離、精製して該特定のタンパク質等のAGEを測定しても良い。特に特定のタンパク質等についてAGE化されたものとAGE化されていないものの割合が臨床的意義を持つ場合もあるので、このような場合には、予め分離、精製して該特定のタンパク質等を含む溶液を被検体とすることが好ましい。このような特定のタンパク質等としては、寿命が長く且つ血中濃度も高いヘモグロビン、或いは沈着アミロイドの主要成分である $\beta 2$ マイクログロブリン($\beta 2\text{M}$)、動脈硬

化の発症と関連の深い低密度リポタンパク質(LDL)や高密度リポタンパク質(HDL)等が挙げられる。

【0014】本発明で使用するアニオン性界面活性剤としては、水に溶解してイオンに解離し、界面活性を示す原子団がアニオンとなる界面活性物質であれば良く、例えばアシルサルコシン、アルキル硫酸ナトリウム、アルキルベンゼンスルホン酸塩等が挙げられるが、被検体、特に体液由来の被検体中のAGEをドットブロッティング法以外の方法で特異抗体を用いて検出する場合には、親水性疎水性バランス(HLB)の大きいドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が特に好適に用いられる。

【0015】被検体の前処理に用いるアニオン性界面活性剤の濃度は特に限定はされないが、被検体の重量に対して0.01～10重量%、更に0.03～5重量%の濃度となるように添加することが好ましい。

【0016】アニオン性界面活性剤を添加した被検体は50～100℃の範囲で加熱処理を行う。これより低い温度だと前処理効果が弱く(図3参照)、これより高い温度だと被検体中のタンパク質が凝集する傾向がある。加熱処理の時間は加熱処理温度に応じて適宜決めればよいが、前処理の効果が安定的に得るためには15分以上、更に60分以上であることが好ましい。

【0017】被検体中のAGEは、前記の方法で前処理された被検体に抗AGE抗体を作用させ、免疫学的反応により検出される。このとき、上記前処理を行った被検体はそのまま抗AGE抗体を作用させ免疫学的反応(抗原抗体反応)を行ってもよいが、抗原抗体反応を良好に行うためには、上記前処理後に被検体中のアニオン性界面活性剤の濃度を0.1wt%以下とするように調整してから抗AGE抗体を作用させることが好ましい。抗原抗体反応時のアニオン性界面活性剤の濃度を0.1wt%以下にする方法としては、例えば、前処理した被検体をアニオン性界面活性剤を含まない緩衝液や水などで希釈する方法、前処理した被検体から限外濾過、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー等でアニオン性界面活性剤を除去する方法等が挙げられる。

【0018】本発明で用いられる抗AGE抗体としては、AGEを認識する特異抗体であれば特に限定されない。このような抗AGE抗体としては、公知の方法で作成されたAGEを免疫原(抗原)としてウサギ、ヤギ、マウス、モルモットなどの宿主動物に免疫して得られた抗血清、或いは該血清を従来公知の方法である塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、電気泳動等で精製して得たポリクローナル抗体を挙げることが出来る。例えば、in vitroでグルコースとタンパク質を37℃で60日間インキュベーションして作成したAGE(メイラード反応のモデル反応)を透析によって精製した後、ウサギに免疫すると約6週間後にAGEに対する抗血清が得られる。

【0019】また、被検体中の特定のAGE構造を検出

する場合には、上記のようにして作成した抗血清、ポリクローナル抗体に加えて、特定のAGE構造で感作した哺乳動物の脾細胞やリンパ節細胞等の抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合して得たハイブリドーマから調製したモノクローナル抗体をそのままか、或いは従来公知の方法である塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティクロマトグラフィ、電気泳動等で精製して抗AGE抗体として用いることができる。

【0020】特定のAGEとして、例えば前述のCM化タンパク質、CM化ペプチド、ピラリン、ペントシジン、クロスリンA&B、ピロピリジン、或いはX1等が挙げられるが、この中でもCM化タンパク質、CM化ペプチドはAGEの主要成分であると考えられており(Ikeda, K., et. al., Biochemistry, vol. 35, p8075, 1996)、被検体中の特定のAGEを検出する場合はCM化タンパク質、CM化ペプチドを測定するのが好適である。CM化タンパク質またはCM化ペプチドを測定するための抗CM化タンパク質抗体または抗CM化ペプチド抗体(以下、これらをまとめて抗CM抗体と呼ぶこともある。)は、前述したように酸素存在下で還元糖とタンパク質を37℃で60日間程度インキュベーションして作成したAGEを免疫原として使用することの他、有機合成的手法を用い合成したCM化タンパク質、CM化ペプチドを免疫原として使用しても得られる。

【0021】タンパク質もしくはペプチドを構成するアミノ酸のアミノ基をカルボキシメチル化(CM化)する方法、即ち、上記各アミノ基の水素を-CH₂-COOH基に置換する方法は、公知の方法が何ら制限無く使用される。例えば「新生化学実験講座1、タンパク質4」(日本生化学会編、第13~16頁、東京化学同人、1991年3月20日発行)に記されている還元アルキル化法のように、CHO-COOHで示されるアルデヒド化合物とタンパク質またはペプチドをホウ酸緩衝液やリン酸緩衝液等の水溶液に溶解し、水素化ホウ素ナトリウムや水素化シアノホウ素ナトリウム等の水素化物還元剤の存在下でpH8~10で反応させればよい。これより高いpHだとタンパク質等が変性する恐れがあり、これより低いpHだと水素化物還元剤が不安定になる。該反応を特異的、且つ定量的に進行させるために、反応温度は0~10℃で行うのがよい。

【0022】抗CM抗体を含む特定のAGEに対する抗体や抗AGE抗体は、抗体分子自体でも良く、またこれらの抗体を酵素処理して得られるF(ab')₂といった抗体の活性フラグメント(抗体の抗原認識部位を含む部分)を使用しても良い。

【0023】本発明において上記の前処理を施した被検体中のAGEを測定する方法としては、抗CM抗体等の抗AGE抗体とCM化タンパク質、CM化ペプチド等のAGEの抗原抗体反応を利用し、被検体中のAGEを測定できる方法であればその態様は特に限定されない。即

ち、後述する非競合法、競合法およびサンドイッチ法等の各方法に対応するように、抗AGE抗体、β2ミクログロブリン(β2M)やヘモグロビンなどの生体成分に対する抗体およびAGEを適宜不溶性担体に担持した形態等をとることができる。このような態様をとる試薬を測定方法に応じて、被検体中のAGEおよび/または抗AGE抗体とを接触させることによって起こる抗原抗体反応を検出することによりAGEが測定できる。このような抗原抗体反応の検出は、免疫学的測定方法がいわゆる免疫凝集法である場合には不溶性担体の凝集などを利用して検出することができるし、免疫学的測定方法がいわゆる標識免疫測定法である場合には比色、発光、蛍光などの物理量の変化として検出することができる。

【0024】本発明の前処理方法で処理した被検体中のAGEの測定方法の具体的な態様を例示すれば、定性的測定法としては、ラテックス凝集法、マイクロタイター法等を、定量的測定法としては、ラジオイムノアッセイ法、エンザイムイムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法、化学発光イムノアッセイ法、ラテックス定量法等を、それぞれ例示できる。

【0025】抗AGE抗体または生体成分に対する抗体、或いは被検体中のAGEを担持する不溶性担体の形状としては、使用目的に応じて形状を適宜選択すればよく、例えば、ビーズ状、テストプレート状、球状、ディスク状、チューブ状、フィルター状等が例示できる。また、その材質としては、通常の免疫測定法用担体として用いられるもの、例えば、ガラス、多糖類又はその誘導体、シリカゲル、多孔性セラミックス、金属酸化物、赤血球、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド等の合成樹脂、又はこれらに公知の方法によりスルホン基、アミノ基などの反応性官能基を導入したものが挙げられる。

【0026】不溶性担体への抗AGE抗体または生体成分に対する抗体、或いは被検体中の抗原の固定化法は、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、架橋法等の公知の方法が何ら制限なく使用できる。

【0027】標識免疫測定法における被検体中のAGEの測定の基本操作は、通常の検定法、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)法、ELISA法、ウエスタンブロットティング法、ドットブロットティング法等の酵素免疫測定(EIA)法等に従うことができる。これら各検定法における操作、手順等は、一般に採用されているそれらと特に異ならず、公知の非競合法、競合法、サンドイッチ法等に準じることができる。非競合法においては、不溶性担体に被検体中のAGEまたは抗AGE抗体を担持した後に、抗AGE抗体またはAGEを接触させればよい。競合法においては、例えば不溶性担体に人工的に作製したAGEを担持した後に、予め被検体中のAGEと反応させた抗AGE抗体を接触させればよい。サンドイッチ法においては、抗AGE抗体、或いはアルブミ

ン、 β 2Mやヘモグロビン等の生体成分に対する抗体を不溶性担体に担持した後に、被検体中のAGEを接触させ、更に生体成分に対する抗体、または抗AGE抗体を接触させればよい。これらの測定方法により、タンパク質またはペプチドのAGE化率、あるいはAGEの量を測定することができる。

【0028】標識免疫測定法に用いる標識剤としては、放射性ヨード、放射性炭素等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光物質、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ等の酵素等をそれぞれ例示できる。かかる方法にて得られた抗原抗体反応生成物は放射能、比色、蛍光、発光等を利用して検出される。

【0029】例えば、抗AGE抗体或いは被検体中のAGEを不溶性担体に0.01~1000 μ g/cm²の割合で担持し、0.001~1000 μ gの被検体中のAGE或いは抗AGE抗体を接触させて測定に供する。生体成分に対する抗体を不溶性担体に担持した場合には、上記したように、被検体中のAGEを接触させた後、更に抗AGE抗体を接触させる。不溶性担体に担持していない当該抗体は、標識剤で標識されたものを使用することが好ましい。

【0030】免疫凝集試薬における被検体中のAGEの測定の基本操作は、通常の検定法、例えば赤血球凝集反応法、受身凝集反応法、免疫比濁法、免疫比濁法等に従うことができる。これら各検定法における操作、手順等は、一般に採用されているそれらに準じることができる。例えば、粒子状の不溶性担体1g当たり0.001~100mgの抗CM抗体を上記方法にて担持した粒子（以下、感作粒子と略す）を、0.001~15重量%となるように水性媒体に分散させて免疫試薬の有効成分として使用すればよい。抗体を担持する不溶性担体の粒径は、抗原抗体反応後の凝集の起こり易さや凝集の判別のし易さなどの観点から平均粒径が0.05~10 μ mの不溶性担体を使用するのが好適である。かかる方法にて作成した感作粒子を検体中の抗原と接触させ、該感作粒子の凝集の度合を測定すれば良い。粒子の凝集の度合は、目視、光学的測定等従来の方法が制限なく使用できる。

【0031】後述する実施例にも示されるように、糖尿病或いは糖尿病合併症患者由来の血液からなる被検体を本発明の前処理方法で前処理したところ、未処理の被検体を用いた場合には検出できなかったAGEが、競合ELISA法にて検出できるようになった。また、前処理方法も従来の方法に比べて簡便であったことから、本発明が臨床検査の領域において特に有用であると思われる。

【0032】

【発明の効果】以上の通り、被検体をアニオン性界面活性剤存在下で加熱処理することによって、ドットブロッ

ティング法以外では検出できなかった生体成分、特に体液由来のAGEが検出できるようになった。このことは、糖尿病、糖尿病合併症または透析アミロイドーシスの新規マーカーとなる可能性の高いAGEを、患者に多大な苦痛を与えることなく採取できる血液や血清、血漿、尿等で容易に短時間で且つ直接的に測定できることを意味するものであり、その工業的意義は大きい。

【0033】

【実施例】以下に本発明をより具体的に説明するために実施例を示すが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0034】実施例1および比較例1

(1) AGE化ヒト血清アルブミン(HSA)の作成
HSAをAGE化するために、pH7.4に調整した50mMリン酸緩衝液に、60mg/mlとなるようにHSA(シグマ社製：fraction V)を、また、1.67Mとなるようにグルコース(和光純薬工業社製)を溶解した。次いで、0.2 μ mのフィルターで無菌的に限外濾過した後、37℃で90日間インキュベーションした。

【0035】90日後、上記溶液を0.15MのNaClを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)(以下、20mM PBSと呼ぶこともある)で4℃にて60時間透析を行った。この間に20mM PBSは12時間おきに4回交換した。

【0036】(2) AGE化HSAに対する抗体の作成
体重が2kg以上のウサギに、上記作成したAGE化HSAを抗原として以下の要領で免疫した。

【0037】2mg/mlになるように調製した該抗原溶液0.5mlに、フロイントの完全アジュバント0.5mlを加えたものをウサギの耳静脈に注射した。その後、2週間おきに2mg/mlの該抗原0.25mlにフロイントの不完全アジュバント0.25mlを加えたものを追加免疫した。この間、AGE化HSAに対する抗体が産生されたか否かを確認するために、2週間に1回ウサギの外縁耳静脈から部分採血した。6週間後、AGE化HSAに対する抗体が産生されたことを酵素免疫測定(ELISA)法で確認し、全採血した。

【0038】(3) アフィニティ精製カラムの作成
5mlのアフィゲル15(BIO-RAD社製)を15mlの10mM酢酸緩衝液(pH4.5)で洗浄した後、20mM PBSに溶解した5mg/mlのHSA溶液を11.6ml加え、室温で1時間緩やかに攪拌した。次いで、未反応のHSAを濾過にて除去し、1Mのエタノールアミンを30ml加え、室温で緩やかに攪拌し、未反応のN-ヒドロキシサクシイミドエステルをブロッキングした。該HSAを固定化した支持体をカラムに詰め、280nmの吸光度が0になるまでイオン交換水で洗浄した。更に、20mM PBSでカラムを平衡化した。

【0039】同様にして、上記AGE化HSAを固定化したカラムも作成した。

【0040】(4) AGE化HSAに対する抗体(抗AGE-HSA抗体)のアフィニティ精製
作成した抗AGE-HSA抗体を1mg/mlになるように20mM PBSで希釈したものを、100mg程度になるように上記HSAを固定化したカラムにアプライした。次いで、280nmの吸光度が0になるまで20mM PBSを流速0.5ml/minで流した。カラムに結合しなかった抗体を抗AGE-HSA抗体として回収した。280nmの吸光度が0になったところで20mM PBSから0.1Mのグリシン緩衝液(pH 3.0)に換え、カラムに結合している不要なタンパク質を溶離させ、20mM PBSでカラムを平衡化し、回収した抗体を再度カラムにアプライし、カラムに結合しなかった抗体を回収した。この操作を、更に1回繰り返した。

【0041】次いで、上記AGE化HSAを固定化したカラムに回収した抗体をアプライし、20mM PBSを流速0.5ml/minで流した。この操作でカラムに結合した抗体を抗AGE-HSA抗体として、20mM PBSから0.1Mのグリシン緩衝液(pH 3.0)に換え、カラムに結合している抗体を溶離させて回収した。回収直後にpHを3.0から7.4に戻した後、20mM PBSで透析した。該抗AGE-HSA抗体はビオチン標識用の抗体に供した。

【0042】(5) 抗AGE-HSA抗体のビオチン標識
精製した抗体のビオチン標識はプロテインビオチニレーションシステム(GIBCO社製)を用いて行った。

【0043】精製した抗AGE-HSA抗体を1.5mg/mlになるように20mM PBSで希釈または濃縮した溶液に、0.05Mになるように炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)を加えた。次いで、該抗体溶液6.7mlに、説明書に従って作成した50mg/mlのCAB-NHSエステル溶液26μlを加え、室温で1時間緩やかに攪拌し、0.11Mになるように塩化アンモニウムを加えて反応を停止させた。その後、本キットに付属のカラムで抗体溶液を脱塩した。更に、キット付属のavidin/HABAで導入されたビオチンのモル数を計算したところ、抗AGE-HSA抗体1モルに対してビオチンは1.4モル結合していた。

【0044】(6) 抗AGE-HSA抗体の抗原特異性
抗AGE-HSA抗体の抗原特異性は競合法ELISAにて確認した。

【0045】1μg/mlとなるように20mM PBSで希釈したビオチン標識抗AGE-HSA抗体に、作成したAGE化HSAをそれぞれ0.1、1、10、100μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、AGE化HSAで阻害された抗体溶液として使用した。

【0046】AGE化HSAの調製と同様の方法で、ヘ

モグロビン(シグマ社製: fractionV、以下Hbと略すこともある)より作成したAGE化Hbを調製した。1μg/mlの抗AGE-HSA抗体溶液に、上記AGE化Hbをそれぞれ0.1、1、10、100μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、AGE化Hbで阻害された抗体溶液として使用した。

【0047】競合法ELISAを行うにあたり、作成したAGE化HSAを1μg/mlとなるように20mM炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈した。次いで、上記希釈したAGE化HSA溶液を96穴イムノプレート(NUNC社製)に1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置し、該AGE化HSAをイムノプレートに固定した。1時間後、イムノプレートに結合していないAGE化HSAを除去し、20mM PBSで3回ウェルを洗浄した後、1wt%の牛血清アルブミン(以下BSAと略すこともある)を含む20mM炭酸緩衝液(pH 9.6)を1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置し、AGE化HSAが結合していない部分をブロッキングした。1時間後、該BSA溶液を除去し、0.05wt%のTween 20(和光純薬工業社製)を含む20mM PBSで3回洗浄した後、上記濃度のAGE化HSAで阻害された抗体溶液、又は上記濃度のAGE化Hbで阻害された抗体溶液を1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置した。その後、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、取扱説明書に従い調製したアルカリホスファターゼで標識されたビオチンとアビジンの混合溶液(フナコシ社製: vectastain ABCキット)を1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置した。更に、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質キット(BIO-RAD社製)を用いて能書に従い調製した基質溶液を1ウェル当たり100μlアプライした。室温で5分間放置した後、0.4Mの水酸化ナトリウム溶液を1ウェル当たり100μl加え、アルカリホスファターゼの反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。結果を図1に示す。この結果から、作成した抗AGE-HSA抗体は、AGE化HSAのみならず、AGE化HbでもAGE化HSAと抗AGE-HSA抗体の反応が阻害されたことから、AGE化Hbとも反応性を示すことが判った。

【0048】(7) 前処理時の至適界面活性剤濃度
糖尿病患者由来の血液をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下で前処理を行った。また、前処理時の至適界面活性剤濃度は競合法ELISAにて確認した。

【0049】上記血液(タンパク質濃度: 200mg/ml)10μlを0.67wt%のSDSを含む蒸留水30μlで溶血させた。該溶血させたサンプルを80℃で1時間インキュベーションしたものを被検体とした。

この時のSDS濃度はタンパク質1mg当たり 0.012wt%であった。

【0050】5μg/mlとなるように20mM PBSで希釈したビオチン標識抗AGE-HSA抗体に、溶血させた被検体をそれぞれタンパク質濃度が1、10、100、1000μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、血中AGEで阻害された抗体溶液として使用した。

【0051】競合法ELISAは上記の方法に準じて行った。即ち、20mM炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈したAGE化HSAを50ng/wellとなるように96穴イムノプレートに固定した。その後、イムノプレートに結合していないAGE化HSAを除去し、20mM PBSで3回ウェルを洗浄した後、1wt%の牛血清アルブミン(以下BSAと略すこともある)を含む20mM炭酸緩衝液(pH9.6)を1ウェル当たり100μlアプラインし、37℃で1時間放置し、AGE化HSAが結合していない部分をブロッキングした。1時間後、該BSA溶液を除去し、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄した後、上記濃度の被検体で阻害された抗体溶液を1ウェル当たり100μlアプラインし、37℃で1時間放置した。その後、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、取扱説明書に従い調製したアルカリホスファターゼで標識されたビオチンとアビジンの混合溶液(フナコシ社製: vectastain ABCキット)を1ウェル当たり100μlアプラインし、37℃で1時間放置した。更に、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ用の基質(DAKO社製: AMPAK)を用いて能書に従い調製した基質溶液を1ウェル当たり100μlアプラインした。室温で20分間放置した後、キット付属の反応停止液を1ウェル当たり25μl加え、アルカリホスファターゼの反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。

【0052】同様にして、上記血液10μlを0.04、0.4、0.67及び6.7wt%(それぞれ処理時の被検体重量に対して0.03、0.3、0.5及び5wt%に対応する)のSDSを含む蒸留水(実施例1)、またはSDSを含まない蒸留水30μlで(比較例1: SDS濃度0wt%)溶血させ80℃で1時間インキュベーションしたものを被検体とし、競合法ELISAを行った。結果を図2に示す。

【0053】この結果から、SDS存在下で加熱処理した被検体はAGE化HSAと抗AGE-HSA抗体の反応を阻害し(実施例1)、SDS非存在下で処理した検体ではAGE化HSAと抗AGE-HSA抗体の反応を阻害しなかった(比較例1)ことから、該処理によってヒト血液中のAGEが検出可能になることが明らかとなった。

【0054】(8) 至適前処理温度

上記同様、糖尿病患者由来の血液をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下で前処理を行った。また、前処理時の至適界面活性剤濃度は競合法ELISAにて確認した。

【0055】上記血液(タンパク質濃度: 200mg/ml)10μlを0.67wt%のSDSを含む蒸留水30μlで溶血させた。該溶血させたサンプルをそれぞれ室温、37、50、60、70、80、90及び100℃で1時間インキュベーションしたものを被検体とした。

【0056】5μg/mlとなるように20mM PBSで希釈したビオチン標識抗AGE-HSA抗体に、溶血させた被検体をそれぞれタンパク質濃度が1000μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、血中AGEで阻害された抗体溶液として使用した。

【0057】競合法ELISAは上記と同様の方法にて行った。結果を図3に示す。

【0058】この結果から、SDS存在下、50℃以上で加熱処理した検体は未処理の被検体と比較して、AGE化HSAと抗AGE-HSA抗体の反応を有意に阻害していることから、該処理は50℃以上で行えばよいことが明らかとなった。一方、100℃を越えると被検体中のタンパク質の凝集が激しくなり、競合法ELISAの被検体としての使用が困難となった。

【0059】実施例2および比較例2

(1) CM化タンパク質の作成

タンパク質のアミノ基をCM化するために、pH9に調整した1mg/mlのHSA 1mlに、pH9に調整した0.25Mのグリオキシル酸(シグマ社製)1mlを混合し、0℃で12時間放置した。その後、1mgの水素化シアノホウ素ナトリウムを加え、更に12時間放置した。

【0060】また、対象として、グリオキシル酸を添加しないこと以外は同様の方法でHSAを処理した。

【0061】上記の各処理後のHSAのCM化率を、未反応アミノ基をトリニトロベンゼンスルホン酸(以下TNBSと略す)を用いて次のような方法により測定して求めた。

【0062】即ち、前記各試料0.5mlを0.1Mの四ほう酸ナトリウムを含む0.1Mの水酸化ナトリウム水溶液0.5mlに各々加えた。次いで、再結晶化し希塩酸で洗浄した後、蒸留水で1.1Mに調製したTNBSを20μl加え、攪拌した。30分後に1.5mMの亜硫酸ナトリウムを含む98.5mMのリン酸二水素ナトリウムを2ml加えて反応を停止させ、蒸留水で10倍に希釈した後に420nmの吸光度を測定したところ、CM化HSAの吸光度は0.03であり、グリオキシル酸処理をしていないHSA(対照)の吸光度は1.

25であった。上記のいずれのHSAも含まない系で同様の測定を行ったところ、吸光度は0.03であったので、CM化HSAのCM化率は100%であることが解った。

【0063】かかる方法で得られたCM化HSAは、20mM PBSで4℃にて2日間透析し、未反応のグリオキシル酸や水素化シアノホウ素ナトリウムを除去した後に、CM化タンパク質に対する抗体の作成のための免疫原として供した。

【0064】(2) CM化HSAに対する抗体(抗CM化HSA抗体)の作成

体重が2kg以上のウサギに、上記作成したCM化HSAを抗原として以下の要領で免疫した。

【0065】2mg/mlになるように調製した該抗原溶液0.5mlに、フロイントの完全アジュバント0.5mlを加えたものをウサギの耳静脈に注射した。その後、2週間おきに2mg/mlの該抗原0.25mlにフロイントの不完全アジュバント0.25mlを加えたものを追加免疫した。この間、CM化HSAに対する抗体が産生されたか否かを確認するために、2週間に1回ウサギの外縁耳静脈から部分採血した。6週間後、抗CM-HSA抗体が産生されたことを酵素免疫測定(ELISA)法で確認し、全採血した。

【0066】(3) アフィニティ精製カラムの作成

25mlのアフィゲル15を75mlの10mM酢酸緩衝液(pH4.5)で洗浄した後、10mg/mlのHSA溶液を62.5ml加え、室温で1時間緩やかに攪拌した。次いで、未反応のHSAを濾過にて除去し、1Mのエタノールアミンを30ml加え、室温で緩やかに攪拌し、未反応のN-ヒドロキシサクシイミドエステルをブロッキングした。該HSAを固定化した支持体をカラムに詰め、280nmの吸光度が0になるまでイオン交換水で洗浄した。更に、20mM PBSでカラムを平衡化した。

【0067】(4) 抗CM-HSA抗体のアフィニティ精製

作成した抗CM-HSA抗体を1mg/mlになるように20mM PBSで希釈したものを、100mg程度になるように該アフィニティ精製カラムにアプライした。次いで、280nmの吸光度が0になるまで20mM PBSを流速0.5ml/minで流した。カラムに結合しなかった抗体を抗CM-HSA抗体として回収した。280nmの吸光度が0になったところで20mM PBSから0.1Mのグリシン緩衝液(pH3.0)に換え、カラムに結合している不要なタンパク質を溶離させ、20mM PBSでカラムを平衡化し、回収した抗体を再度カラムにアプライし、カラムに結合しなかった抗体を回収した。この操作を、更に1回繰り返し、ビオチン標識用の抗体に供した。

【0068】(5) 抗CM-HSA抗体のビオチン標識

精製した抗体のビオチン標識はプロテインビオチニレーションシステム(GIBCO社製)を用いて実施例1と同様の方法にて行った。抗CM-HSA抗体1モルに対してビオチンは14モル結合していた。

【0069】(6) 抗CM-HSA抗体の抗原特異性
CM化HSAが1μg/mlとなるように20mM PBSで希釈した抗CM-HSA抗体に、作成したCM化HSAをそれぞれ0.1、1、10、100μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、CM化HSAで阻害された抗体溶液として使用した。

【0070】CM化HSAの調製と同様の方法で、ヘモグロビン(Hb:シグマ社製)より作成したCM化Hbを調製した。該CM化Hbを1μg/mlの抗CM-HSA抗体溶液に、それぞれ0.1、1、10、100μg/mlとなるように添加した。この溶液を37℃で1時間放置し、CM化Hbで阻害された抗体溶液として使用した。

【0071】競合法ELISAを行うにあたり、作成したCM化HSAを1μg/mlとなるように20mM PBSで希釈した。次いで、上記希釈したCM化HSA溶液を96穴イムノプレート(NUNC社製)に1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置し、該CM化HSAをイムノプレートに固定した。1時間後、イムノプレートに結合していないCM化HSAを除去し、0.5wt%のゼラチンを含む20mM PBSを1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置し、CM化HSAが結合していない部分をブロッキングした。1時間後、該ゼラチン溶液を除去し、20mM PBSで3回洗浄した後、上記濃度のCM化HSAで阻害された抗体溶液、又は上記濃度のCM化Hbで阻害された抗体溶液を1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置した。その後、20mM PBSで3回洗浄し、上記作成したビオチン標識抗CM-HSA抗体を1ウェル当たり0.1μgアプライし、37℃で1時間放置した。更に、20mM PBSで3回洗浄し、取扱説明書に従い調製したアルカリホスファターゼで標識されたビオチンとアビジンの混合溶液(フナコシ社製: vectastain ABCキット)を1ウェル当たり100μlアプライし、37℃で1時間放置した。更に、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質キット(BIO-RAD社製)を用いて能書に従い調製した基質溶液を1ウェル当たり100μlアプライした。室温で5分間放置した後、0.4Mの水酸化ナトリウム溶液を1ウェル当たり100μl加え、アルカリホスファターゼの反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。結果を図4に示す。この結果から、作成した抗CM-HSA抗体は、CM化HSAのみならず、CM化HbでもCM化HSAと抗CM-HSA抗体の反応が阻害されたことから、C

M化Hbとも反応性を示すことが判った。

【0072】(7) 被検体の前処理

実施例1で処理した糖尿病患者由来の血液を実施例1と同様の操作にて競合法ELISAにて確認した。結果を図5に示す。

【0073】同様に、上記血液10 μ lを0.04、0.4、0.67、6.7wt%のSDSを含む蒸留水（実施例2）、またはSDSを含まない蒸留水30 μ l（比較例2）で溶血させ80℃で1時間インキュベーションしたものを被検体とし、競合法ELISAを行

った。結果を図5に示す。
【0074】この結果から、SDS存在下で加熱処理した検体はCM化HSAと抗CM-HSA抗体の反応を阻害し（実施例2）、SDS非存在下で処理した検体ではCM化HSAと抗CM-HSA抗体の反応を阻害しなかった（比較例2）ことから、該処理によってヒト血液中のCM化タンパク質が検出可能になることが明らかとなった。

【0075】(8) 前処理した血液中のCM化タンパク質の測定

糖尿病患者2人、および健常者2人よりEDTA-2Kを含む真空採血管にて採取した血液を実施例1と同様の操作にて前処理し、血液中のCM化タンパク質を競合法ELISAにて測定した。即ち、血液10 μ lを0.6*

表1

検体	血中タンパク質のカルボキシメチル化率(%)
健常者1	0.92
健常者2	0.81
糖尿病患者1	1.29
糖尿病患者2	1.43

【図面の簡単な説明】

【図1】本図は、作成した抗AGE-HSA抗体の抗原特異性を競合法ELISAにて調べた結果で、縦軸が405nmの吸光度、横軸が各阻害剤の添加量である。

【図2】本図は、被検体の前処理時の至適界面活性剤濃度を抗AGE-HSA抗体を用いて競合法ELISAにて検討した結果で、縦軸が405nmの吸光度、横軸が前処理した被検体の添加量〔各well当たりの添加されたタンパク質（阻害剤）の量〕である。また、図中の各線の%表示は前処理時の被検体重量に対するSDSの濃度（wt%）を表す。

【図3】本図は、被検体の前処理時の至適温度を抗CM-HSA抗体を用いて競合法ELISAにて検討した結果で、※

*7wt%のSDSを含む蒸留水30 μ lで溶血させ80℃で1時間インキュベーションしたものを被検体とし、競合法ELISAを行った。

【0076】競合法ELISAは実施例1と同様の方法にて行った。ヘモグロビン濃度をシアンメトヘモグロビン法にて測定した後、該ヘモグロビンが20 μ g/wellとなるようにCM化HSAを固定したブロッキング済96穴イムノプレート（NUNC社製）にアプライし、次いでビオチン標識抗CM-HSA抗体を1ウェル当たり0.5 μ gアプライした後、37℃で1時間放置した。更に、20mM PBSで3回洗浄し、取扱説明書に従い調製したアルカリホスファターゼで標識されたビオチンとアビジンの混合溶液（フナコシ社製：vectastain ABCキット）を1ウェル当たり100 μ lアプライし、37℃で1時間放置した。更に、0.05wt%のTween 20を含む20mM PBSで3回洗浄し、アルカリホスファターゼ基質キット（BIO-RAD社製）を用いて能書に従い調製した基質溶液を1ウェル当たり100 μ lアプライした。室温で5分間放置した後、0.4Mの水酸化ナトリウム溶液を1ウェル当たり100 μ l加え、アルカリホスファターゼの反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。測定結果を表1に示す。

【0077】

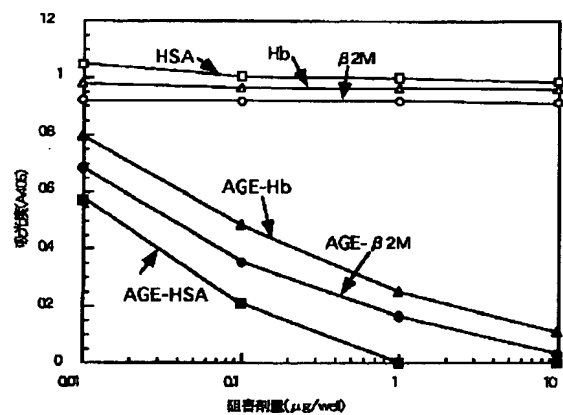
【表1】

※縦軸が405nmの吸光度、横軸が前処理時の温度である。

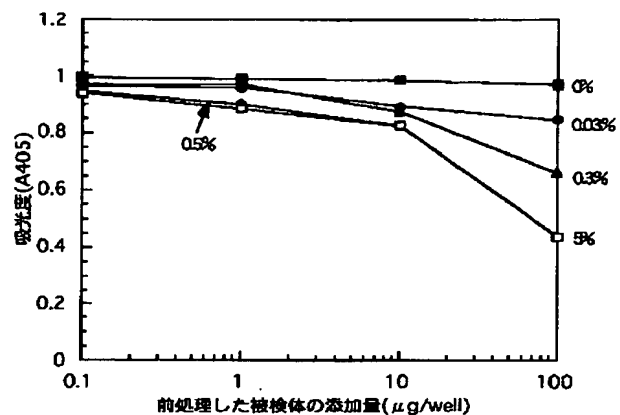
【図4】本図は、作成した抗CM-HSA抗体の抗原特異性を競合法ELISAにて調べた結果で、縦軸が405nmの吸光度、横軸が各阻害剤の添加量〔各well当たりの添加されたタンパク質（阻害剤）の量〕である。

【図5】本図は、被検体の前処理効果を抗CM-HSA抗体を用いて競合法ELISAにて検討した結果で、縦軸が405nmの吸光度、横軸が前処理した被検体の添加量〔各well当たりの添加されたタンパク質（阻害剤）の量〕である。

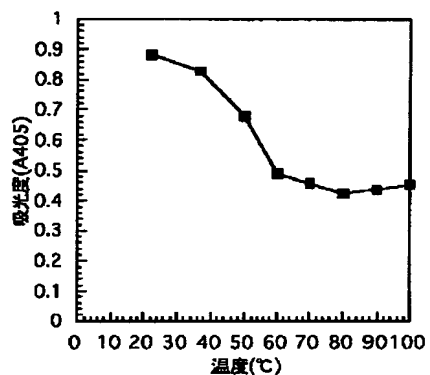
【図1】



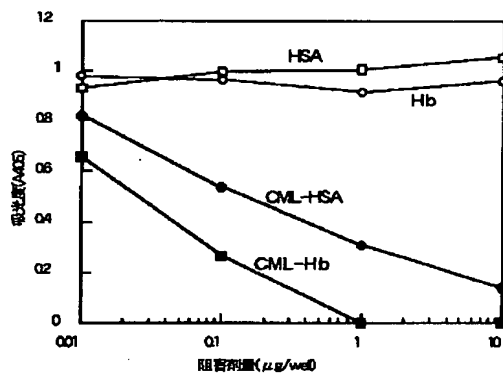
【図2】



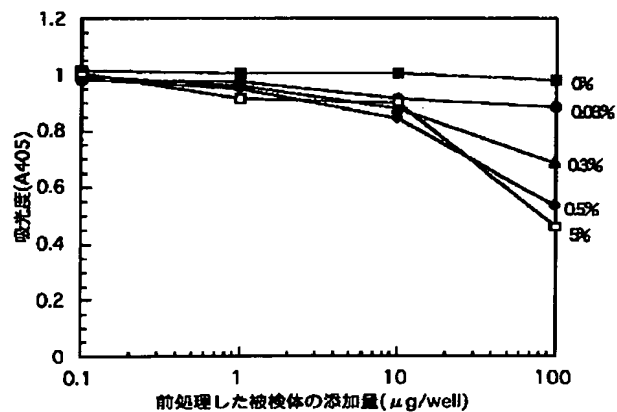
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 吉村 佳典

山口県徳山市御影町 1 番 1 号 株式会社ト
クヤマ内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.